

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

AE

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  C07K 14/755, 1/22		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/39033</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Oktober 1997 (23.10.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT97/00069		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 9. April 1997 (09.04.97)			
(30) Prioritätsdaten: A 667/96 12. April 1996 (12.04.96) AT		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67. A-1221 Wien (AT).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHÖNHOFER, Wolfgang [AT/AT]; Ringelnatzgasse 5/C1, A-3100 St. Pölten (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT). WEBER, Alfred [AT/AT]; Skraupstrasse 24/42/8, A-1210 Wien (AT). LINNAU, Yendra [AT/AT]; Lavendelweg 24, A-1224 Wien (AT).			
(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).			
<p><b>(54) Title:</b> PURIFICATION OF FACTOR VIII COMPLEX BY IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY</p> <p><b>(54) Bezeichnung:</b> REINIGUNG VON FAKTOR VIII-KOMPLEX DURCH IMMUNAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE</p> <p><b>(57) Abstract</b></p> <p>This invention concerns a highly purified complex consisting of the components factor VIII and vWF, with a specific activity of at least 70, preferably 100 to 300 E of factor VIII/mg, a stable pharmaceutical preparation containing this complex, and a process based on immunoaffinity chromatography for its production.</p> <p><b>(57) Zusammenfassung</b></p> <p>Beschrieben wird ein hochgereinigter Komplex bestehend aus den Komponenten Faktor VIII und vWF, mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 70, vorzugsweise 100 bis 300 E Faktor VIII:C/mg, eine stabile pharmazeutische Präparation enthaltend diesen Komplex, sowie ein immunaffinitätschromatographisches Verfahren zur Herstellung desselben.</p>			

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## REINIGUNG VON FAKTOR VIII-KOMPLEX DURCH IMMUNAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Die vorliegende Erfindung betrifft einen hochgereinigten Komplex bestehend aus den Komponenten Faktor VIII (Faktor VIII:C oder FVIII) und von Willebrand-Faktor (vWF), eine stabile pharmazeutische Präparation, enthaltend den hochgereinigten Komplex, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines hochgereinigten Faktor VIII:C/vWF-Komplexes.

Von Willebrand-Faktor ist ein multimeres Glykoprotein, welches von einem Gen auf Chromosom 12 codiert wird und im Plasma in Konzentrationen von 5 bis 10 µg/ml frei und als nicht-kovalenter Komplex mit Gerinnungsfaktor VIII, dem Protein, welches durch ein Gen auf Chromosom 10 codiert wird und in Haemophilie A defekt ist bzw. fehlt, zirkuliert.

Zu den zwei wichtigsten Funktionen von vWF in der Haemostase zählen:

1) die Adhäsion der Thrombozyten an verletztes Endothel, wobei vWF an das verwundete Sub-Endothelium bindet, und eine Brücke zwischen dieser Oberfläche und den Blutplättchen sowie eine Aggregation der Plättchen untereinander ermöglicht. Die erste Interaktion zwischen Thrombozyten und Subendothel erfolgt über das Glykoprotein Ib der Thrombozytenmembran und den Kollagenfasern des verletzten Endothels. An diesen beiden Proteinen bindet vWF und vermittelt so die Bildung einer ersten Thrombozytenschicht. Die weitere Vernetzung der Blutplättchen untereinander vermittelt vWF durch die Bindung an den Glykoproteinkomplex IIb/IIIa. Für diese Aufgaben der primären Haemostase sind hauptsächlich die großen Multimeren verantwortlich. (Eller; Lab. Med. (1994); 18: 168-176)

2) durch seine Bindungsstelle für FVIII beeinflußt vWF auch die plasmatische Gerinnung. FVIII liegt im Plasma fast ausschließlich in einem nicht-kovalenten Komplex mit vWF vor, wobei etwa jedes zehnte vWF-Molekül ein FVIII-Molekül trägt. Als Träger dienen vor allem Dimere und kleine Multimere. Durch diese Kom-

- 2 -

plexierung mit vWF ist FVIII vor einer verstärkten proteolytischen Inaktivierung (z.B. durch aktiviertes Protein C) geschützt.

Desweiteren wird FVIII durch die Komplexbildung hinsichtlich seiner Cofaktoraktivität in der intrinsischen Gerinnung potenziert (Eller; Lab. Med. (1994); 18: 168-176).

vWF wird in den vaskulären Endothelzellen, welche die Hauptquelle dieses Plasmaproteins bilden, durch konstitutive oder stimulierte Freisetzung gebildet, aber auch in einem geringeren Anteil durch die Megakariozyten synthetisiert (PNAS 92 (1995), 2428-2432).

Das primäre Produkt der Translation besteht aus 2813 Aminosäuren. Nach Abspaltung des Signalpeptids (22 Aminosäuren) kommt es zur Dimerisierung. Die weitere Prozessierung erfolgt im Golgi-Apparat, wobei die Dimere unter Abspaltung des Propeptids (741 Aminosäuren) polymerisiert. Das Propeptid spielt bei der weiteren Verknüpfung der Dimere eine wichtige Rolle, wobei es die Ausbildung von Disulfidbrücken am aminoterminalen Ende katalysiert. Somit entwickeln sich unterschiedlich große Oligomere von der Größe eines Dimers mit 500.000 Dalton bis zu großen Multimeren mit bis zu 20 Millionen Dalton. Zusätzlich zu den proteolytischen Vorgängen ist der vWF noch anderen posttranslationalen Modifikationen unterworfen, einschließlich der Glykosylierung und Sulfatierung. (Mancuso et al.; Hämostaseologie (1989); 9: 122-129)

Aus der Komplexizität der Biosynthese resultiert daher eine Vielzahl verschiedenster vWF-Moleküle mit unterschiedlichsten Aufgaben und Eigenschaften.

Dies führt dazu, daß von Willebrand-Faktor sehr unterschiedliche Bindungsaktivitäten zu seinen natürlichen Bindungspartnern aufweisen kann. Insbesondere zeigte sich, daß die Bindungen verschiedener vWF-Moleküle zum Glykoprotein Ib, zu Kollagen, zu Heparin, zum Glykoprotein IIb/IIIa-Komplex, zu Faktor VIII und zum Sub-Endothelium unterschiedlich stark sein können.

Dies bedeutet aber, daß jede vWF-Präparation aus einem Gemisch dieser verschiedenen vWF-Proteine bzw. vWF-Aggregate zusammengesetzt ist und daher bezüglich der Eigenschaften, wie die essentielle Bindungsstärke zu Faktor VIII, heterogen ist.

Das Auftreten von verschiedenen Formen von vWF begründet auch die komplexen und unterschiedlichen Phänotypen bei der Pathophysiologie der von Willebrand-Krankheit, welche in bestimmten Fällen auf eine Unter-, in anderen Fällen auf eine Überproduktion des von Willebrand-Faktors zurückzuführen ist. So führt z.B. eine Überproduktion von vWF zur vermehrten Neigung von Thrombosen, wohingegen eine Unterversorgung von vWF eine vermehrte Blutungsneigung oder verlängerte Blutungszeit zur Folge hat, jedoch ist dies keineswegs generell gültig, entscheidend ist nämlich auch, in welcher Form der von Willebrand-Faktor über- oder unterproduziert wird.

Zur Unterscheidung und Charakterisierung der Eigenschaften des vWF und des vWF-Syndroms werden eine Reihe von Analysenmethoden eingesetzt.

So ist für die Diagnostik die Ristocetin-Cofaktor-Aktivitätsbestimmung unentbehrlich. Dabei wird die Thrombozytenaggregation in Gegenwart des Antibiotikums Ristocetin untersucht, welche bei Patienten mit vWF-Syndrom vermindert oder überhaupt nicht vorhanden ist. (Macfarlane et al.; Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica 1775; 34: 306-308).

Des Weiteren kann die Kollagenbindungsaktivität des vWF zur Differenzierung des vWF-Syndroms herangezogen werden (Thomas et al.; Hämostaseologie (1994); 14: 133-139).

Die Bindungsdissoziationskonstante zwischen vWF und FVIII kann nach der Methode von Vlot et al. bestimmt werden (Blood 83 (11) (1995); 3150-3157).

Der molekulare Aufbau des vWF wird durch Analyse der Multimerstruktur mittels einer SDS-Elektrophorese in 1,2 % Agarosegelen bestimmt (Ruggeri et al.; Blood (1981); 57: 1140- 1143).

Zur Bestimmung der vWF-Antigen-Gesamtmenge werden verschiedenste kommerziell erhältliche ELISA-Testkits herangezogen.

Die Herstellung eines optimalen FVIII/vWF-Komplexes sollte sich zum Ziele setzen, ein stabiles, vor allem aber ein von unerwünschten Begleitproteinen freies Produkt zu liefern, da jede unnötige Proteinfracht das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen in sich birgt.

Somit stellt jede Konzentration an vWF, die nicht zur Stabilisierung von FVIII notwendig ist, eine Belastung des Hämophilen dar.

Bisher konnte im Zuge von Herstellungsverfahren für von Willebrand-Faktor-Präparationen, insbesondere aus Plasmapools, das Risiko einer heterogenen Zusammensetzung auf Grund der verschiedenen auftretenden Formen des von Willebrand-Faktors nie ausgeschalten werden und es ist bisher im Stand der Technik nicht gelungen, eine vWF-Präparation mit einheitlichen Eigenschaften, beispielsweise bezüglich der Bindungsaktivität zu einem bestimmten Liganden, zu gewinnen.

Es war bekannt, Faktor VIII-Komplex mittels verschiedener anti-vWF-monoklonaler Antikörper sowohl aus Plasma als auch aus Kryopräzipitat zu reinigen (Thromb. Haemostas. 57 (1987), 102-105). Dabei wurde auch die Stabilität des FVIII/vWF-Komplexes in unterschiedlichen Puffern bei pH 6,5 getestet, darunter solche, die Glykole, Aminosäuren, Chaotropen, Amine, andere Salze oder organische Lösungsmittel und/oder Detergentien enthalten. Der Zusatz von Lysin zu Pufferlösungen mit chaotropen Stoffen in höher Konzentration, wie z.B. 3M Harnstoff, bewirkte einen Schutz von Faktor VIII:C/vWF:Ag gegenüber denaturierenden Effekten. Die Aktivitäten von Faktor VIII:C und vWF R.cof. betrugen beispielsweise nach Inkubation mit 20 % V/V Ethylenglykol + 1 M KJ 72 % bzw. 48 %, bei Behandlung mit 3 M Harnstoff 88 % bzw. 77 %.

Die spezifische Aktivität von Faktor VIII:C in einem Endprodukt, eluiert mit 1 M KJ + 1 M Lysin + 20 mM Imidazol + 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,5 betrug 45 I.E./mg Gesamtprotein, jene von vWF 60 I.E./mg.

Es wurde auch berichtet, Faktor VIII/vWF-Komplex aus Kryopräzipitat nach Adsorption an  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , und Durchführung einer Virusinaktivierung unter Verwendung von anti-vWF monoklonaler Antikörper chromatographisch zu reinigen (Biotechnol. Blood Prot. 227 (1993), 109-114). Die Elution des adsorbierten Komplexes erfolgte bei pH 6,5 unter Zusatz des chaotropen Agens KJ (1 M). Das Verhältnis Faktor VIII:C/vWF:AG betrug 0,8, die spezifische Aktivität von Faktor VIII:C 38 i.u./mg.

Schließlich ist aus der EP-0 295 645-A2 bekannt, Faktor VIII-Komplex mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung spezifischer, gegen vWF gerichteter Peptide aus heterogenen biologischen Flüssigkeiten zu reinigen. Der Komplex wurde dabei unter Verwendung von pH-Gradienten oder Puffern mit hoher Ionenstärke eluiert (siehe Beispiel 5 der EP-0 295 645-A2).

In der EP 0 416 983 A1 wird eine Präparation mit dem Faktor VIII/vWF-Komplex beschrieben, welche durch Anionenaustauschchromatographie hergestellt wurde. Gemäß der WO 86/01718 A1 wurde eine Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation mittels Chromatographie an einem monoklonalen Antikörper erhalten.

Allen diesen Faktor VIII/vWF-Komplexen im Stand der Technik ist gemein, daß sie trotz hoher Anreicherung und Aufreinigung der Präparate kein in bezug auf vWF homogenes Präparat, was seine Bindung gegenüber Faktor VIII:C anbelangt, zur Verfügung stellen konnten und daher kein nativer Faktor VIII/vWF-Komplex mit hoher spezifischer Aktivität existierte.

Die vorliegende Erfindung stellt sich daher zur Aufgabe, eine Faktor VIII/vWF-Präparation, enthaltend einen Faktor VIII/vWF-Komplex, zur Verfügung zu stellen, welcher in bezug auf die Bindungseigenschaften des vWF bezüglich des Faktor VIII eine einheitliche Struktur aufweist und daher besonders verträglich bzw. stabil ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine Präparation, enthaltend einen hochgereinigten Komplex, bestehend aus den Komponenten Faktor VIII und von Willebrand-Faktor mit einer spezifi-

ischen Aktivität von mindestens 70, vorzugsweise 100 bis 300 E Faktor VIII:C/mg gelöst, welcher durch Reinigen eines Ausgangsmaterials, enthaltend Faktor VIII:C und vWF, mittels Affinitätschromatographie erhältlich ist, wobei der Komplex aus Faktor VIII:C und vWF sowie der nicht komplizierte Faktor VIII:C bzw. vWF fraktioniert eluiert werden. Dabei wird nicht-komplizierter, also überschüssiger, Faktor VIII:C bzw. von Willebrand-Faktor durch Immunaffinitätschromatographie abgetrennt, insbesondere durch die fraktionierte Elution, bei der der komplizierte und nicht-komplizierte Faktor in getrennten Fraktionen erhalten wird.

Durch den erfindungsgemäßen Abtrennungsschritt von nicht-kompliziertem Faktor VIII:C bzw. von Willebrand-Faktor werden gezielt insbesondere von Willebrand-Faktor-Moleküle mit beeinträchtigter Affinität zu Faktor VIII abgetrennt, und es wird erstmalig ein homogener, nativer Faktor VIII/vWF-Komplex erhalten, der eine bezüglich der Affinität zu Faktor VIII definierte Fraktion des vWF enthält.

Der erfindungsgemäße Komplex ist überraschenderweise bei der Immunaffinitätschromatographie in einem chaotopen Milieu beständig. Sogar in einem Medium mit einer Leitfähigkeit von bis zu 30 mS, vorzugsweise bis zu 40 mS, ist keine Dissoziation des Komplexes festzustellen. So kann der stabile Komplex des Faktor VIII und vWF von der anti-vWF-Säule sogar bei einer relativ hohen Ionenstärke entsprechend einer 2- bis 3-fach isotonen Lösung, eluiert und gewonnen werden.

Im erfindungsgemäßen Komplex weist der vWF vorzugsweise eine Kollagenbindungsaktivität im Bereich von 0,2 bis 0,6, bezogen auf das vWF-Antigen (Plasmaeinheit/Plasmaeinheit), auf.

Der erfindungsgemäße Komplex ist vorzugsweise erhältlich durch Reinigen eines die beiden Komponenten enthaltenden Ausgangsmaterials, wobei der Komplex sowie der separate Faktor VIII:C bzw. vWF vom Immunaffinitätsträger fraktioniert eluiert werden.

Die Elutionsmittel können auch relativ hohe Konzentrationen an

Chaotropen bzw. chaotrop wirksamen Salzen enthalten, da die Immunaffinitätschromatographie vorzugsweise an Antikörpern vorgenommen wird, die ihre Affinität bzw. Avidität gegen Faktor VIII oder vWF auch unter stringenten Bedingungen beibehalten und der erhaltene Faktor VIII/vWF-Komplex auch unter diesen Bedingungen stabil bleibt.

Beispielsweise werden Antikörper ausgewählt, die das Antigen ohne Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften bis zu 1 M NaSCN oder 0,5 M Guanidinhydrochlorid, oder sogar bis zu 100 % Sättigung Ammoniumsulfat binden. Jeweils 50% des Antigens werden noch bis zu 1,5 M NaSCN bzw. 0,75 M Guanidinhydrochlorid, 80 % Ethyenglykol, oder 0,75 M Harnstoff gebunden. Die für die Immunaffinitätschromatographie verwendeten Antikörper sind bevorzugterweise starke Antikörper, welche in einem Bindungstest an das immobilisierte Antigen auch aus verdünnten Lösungen von maximal 30 ng/ml, vorzugsweise maximal 15 ng/ml, binden, entsprechend einem Antikörper/Antigenverhältnis von 1:5 bis 1:20.

Aufgrund der hervorragenden Eigenschaften des erfindungsgemäßen Komplexes in bezug auf seine Homogenität, insbesondere hinsichtlich der Faktor VIII-Bindungseigenschaften des enthaltenen vWF, ist er besonders geeignet zur Herstellung von pharmazeutischen Präparationen zur Verabreichung von Faktor VIII und/oder vWF. Es zeigte sich, daß der erfindungsgemäße Komplex in einer gegenüber Plasma um mindestens 5000-fach, vorzugsweise 7100- bis 21 400-fach, angereicherten Konzentration gewonnen werden kann. Eine besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist daher eine stabile pharmazeutische Präparation, enthaltend den erfindungsgemäßen hochgereinigten Komplex in einer gegenüber Plasma mindestens 5000-fach, vorzugsweise 7100- bis 21 400-fach, angereicherten Konzentration, wobei der Komplex eine hohe Komplex-Bindungsstärke aufweist und im wesentlichen frei von nicht-komplexiertem vWF bzw. Faktor VIII:C ist. Dadurch wird gewährleistet, daß kein überschüssiger vWF oder andere Proteine den Patienten belastet, bei Erhaltung der physiologischen Aktivität des Faktor VIII/vWF-Komplexes. Das erfindungsgemäße Präparat zeichnet sich also durch seine hervorragende physiologische Akzeptanz aus.

Die Freiheit von nicht-komplexiertem vWF und/oder Faktor VIII:C bedeutet, daß weniger als 5 %, vorzugsweise weniger als 1 %, an freiem vWF bzw. Faktor VIII:C, bezogen auf den Gesamtproteingehalt, in der pharmazeutischen Präparation gefunden werden kann. Besonders bevorzugt sind Präparationen, bei welchen kein nicht-komplexierter vWF:Ag bzw. Faktor VIII:C nachgewiesen werden kann.

Der Nachweis von nicht-komplexiertem vWF bzw. Faktor VIII erfolgt durch Rechromatographie des erfindungsgemäßen Komplexes am Immunaffinitätsmaterial, wobei dieses Material mit einer bestimmten Menge an freiem vWF bzw. Faktor VIII beladen wird, der Komplex erneut adsorbiert und in zuvor beschriebener Weise eluiert wird. Das nach Rechromatographie erhaltene Material enthält das gleiche Verhältnis Faktor VIII:C zur vWF:Ag wie im Ausgangsmaterial und zeigt daher keine relativen Verluste. Ein weiterer Test zum Nachweis von nicht-komplexgebundenem Faktor VIII und vWF ist die Bindung des Komplexes an immobilisierte Faktor VIII:C-Antikörper oder vWF-Antikörper, wobei nach der Adsorption kein wesentlichen Anteil, d.h. weniger als 5 %, an ungebundenem vWF bzw. Faktor VIII:C im Überstand nachgewiesen werden kann.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Präparation zeichnet sich durch eine hohe Zuverlässigkeit bezüglich ihres Wirkungsspektrums aus, wobei das Risiko des Abbaus bzw. der Aktivierung des Faktor VIII durch den geringen Anteil an freiem Faktor VIII:C bzw. leicht-dissoziierbarem Faktor VIII:C erheblich gegenüber bekannten Faktor VIII:C/vWF-Komplexpräparationen reduziert ist.

Es versteht sich von selbst, daß die pharmazeutische Präparation, enthaltend den erfindungsgemäßen Komplex, geeignete pharmazeutische Wirk-, Puffer-, Hilfs- oder Zusatzstoffe aufweisen kann, welche für Faktor VIII/vWF-Präparate verwendet werden. Aufgrund der ausgezeichneten Stabilität des Faktor VIII/vWF-Komplexes kann dieser aber auch ohne weitere Verwendung üblicher Stabilisatoren, wie Albumin, Zucker, insbesondere Trehalose oder Saccharose, zu einem stabilen pharmazeutischen Präparat verarbeitet werden.

Das erfindungsgemäße pharmazeutische Präparat ist auch in Lösung bei neutralem pH ausreichend stabil, daß es als Flüssigpräparat bzw. flüssig-tiefgefrorenes Präparat zur Verfügung gestellt werden kann. Nach Rekonstitution eines entsprechenden lyophiliisierten Präparates kann ebenfalls eine etwa gleichbleibende Zusammensetzung des Komplexes gezeigt werden.

Die zu verabreichende Dosis bzw. Konzentrationen des Komplexes im Präparat kann ebenfalls leicht vom Fachmann aufgrund der im Stand der Technik bekannten Verabreichungsregime für Faktor VIII/vWF-Präparate bestimmt werden.

Der Faktor VIII und/oder vWF kann im erfindungsgemäßen Präparat als natives Protein, oder dessen Derivat, beispielsweise als durch Deletion, Substitution oder Insertion mutiertes Protein oder als chemisches Derivat bzw. als Fragment enthalten sein, soferne die hohe Bindungsaffinität des Faktor VIII zu vWF im Komplex erhalten bleibt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren, mit welchem der erfindungsgemäße Komplex hergestellt werden kann, welches das Reinigen eines Ausgangsmaterials, enthaltend Faktor VIII:C und vWF, mittels Immunaffinitätschromatographie umfaßt, wobei der Komplex aus Faktor VIII:C und vWF sowie der nicht-komplexierte Faktor VIII:C bzw. vWF fraktioniert eluiert werden. Durch die gezielte fraktionierte Eluierung der nicht-komplexierten Faktoren vom Komplex ist es erstmals gelungen, eine in Bezug auf eine bestimmte Bindungsstärke einheitliche von Willebrand-Faktor-Präparation bzw. einen Faktor VIII/vWF-Komplex zu erhalten.

Bevorzugterweise werden zur Immunaffinitätschromatographie Antikörper eingesetzt, die gegen den vWF gerichtet sind. Dadurch kann das Reinigungsverfahren, welches im wesentlichen auf die Fraktionierung unterschiedlicher vWF-Moleküle oder -Einheiten abzielt, noch mehr auf die unterschiedliche Natur des von Willebrand-Moleküls ausgerichtet werden.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen

Verfahrens werden als Antikörper monoklonale Antikörper verwendet. Diese sind in bezug auf ihre Einheitlichkeit einem polyklonalen Antiserum vorzuziehen.

Ein bevorzugter Elutionspuffer für den erfindungsgemäßen Komplex bei der Affinitätschromatographie ist ein Puffer enthaltend ein Thiocyanat und/oder ein Ammoniumsalz, vorzugsweise in einer Konzentration von nicht mehr als 2 M, am meisten bevorzugt im Bereich von 0,05 M bis 1,5 M. Dieser erste Elutionspuffer kann vorzugsweise Ethylenglykol, Glycerin oder ein Polyalkylenglykol enthalten.

Nicht-komplexierter Faktor VIII:C bzw. vWF werden bevorzugterweise mit einem Puffer enthaltend ein chaotropes Agens, insbesondere Thiocyanat, und/oder Ammoniumsalz, und/oder Alkalisalze und/oder Ethylenglykol, Glycerin oder ein Polyalkylenglykol eluiert und ebenfalls als homogene Präparationen gewonnen. Der Puffer weist dabei eine gegenüber dem ersten Elutionspuffer erhöhte Konzentration bzw. Leitfähigkeit auf, insbesondere eine um mehr als 20 %, vorzugsweise mehr als 50 % bis 100 % höhere Konzentration bzw. Leitfähigkeit.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung besteht daher in einer von Willebrand-Präparation, welche eine verringerte Bindungs- bzw. Komplexierungskapazität gegenüber Faktor VIII:C aufweist und durch das vorliegende Verfahren gewonnen werden kann.

Der hochgereinigte Komplex, aber auch die erfindungsgemäßen nicht-komplexierten Faktor VIII:C- bzw. vWF-Präparationen können gegebenenfalls durch weitere chromatographische Schritte, bevorzugterweise Ionenaustauscherchromatographie, Gelfiltration, hydrophobe Chromatographie, Affinitätschromatographie, insbesondere an immobilisiertem Heparin, oder Metallionenchelatchromatographie, weiter aufgereinigt und in bekannter und geeigneter Weise zu pharmazeutischen aber auch diagnostischen Präparaten aufgearbeitet werden.

Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten ist es in

der Regel notwendig, eine Behandlung zur Inaktivierung oder Abreicherung von Viren, vorzugsweise eine Hitzebehandlung und/oder eine physikalische bzw. chemische Behandlung, vorzusehen. Geeignete Behandlungsverfahren sind in der EP-0 159 311, der EP-0 519 901 sowie der WO 94/13329 beschrieben. Da der erfundungsgemäße Komplex eine hohe Stabilität aufweist, wird diese Virusinaktivierungsbehandlung vorzugsweise am hochgereinigten Komplex durchgeführt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens wird das Ausgangsmaterial ausgesucht aus der Gruppe bestehend aus Plasma, einer Plasmafraktion wie beispielsweise Kryopräzipitat oder einem Alkoholpräzipitat, einem Zellkulturerstand und einem pharmazeutischen Präparat.

Die Erfahrung wird anhand der folgenden Beispiele, auf die sie jedoch nicht eingeschränkt sein soll, näher erläutert.

**B e i s p i e l 1 : (derzeit nach Ansicht der Anmelderin der beste Weg zur Ausführung der beanspruchten Erfahrung)**

500 g Kryopräzipitat werden in Lösepuffer 1 + 4 bei 30°C gelöst. Danach wird die Lösung über ein 0,45 µm-Filter (z.B. Millipore Durapore) geklärt. Eine mit 0,5 l anti-vWF-Gel (Fa. IMMUNOTECH, Frankreich) gefüllte Säule wird mit ca. 10 Säulenvolumina (= SV) Äquipuffer vorbereitet und darauf wird die geklärte Kryopräzipitatlösung mit 0,5 cm/min aufgetragen. Störende Verunreinigungen werden danach mit 5 bis 10 SV Äquipuffer (ev. mit erhöhter NaCl-Konzentration >250 mM) bei einer Flußrate von 1 cm/min ausgewaschen. Mit Elutionspuffer 1 wird dann der Faktor VIII/vWF-Komplex in einem ungefähren Verhältnis 1 : 1 eluiert. Die Elution mit Elutionspuffer 2 liefert vWF, der fast vollständig frei von Faktor VIII ist. Der zweite Elutionsschritt dient gleichzeitig zur Reinigung der Säule, sodaß danach sofort wieder äquilibriert werden kann.

**Lösepuffer:** 7,5 mM Tris  
60 mM NaCl  
100 mM Lysin

- 12 -

100 mM Na-Acetat pH 6,8  
 25 E/ml Heparin

**Äquipuffer:** 10 mM Tris  
 100 mM NaCl  
 100 mM Lysin  
 3,25 mM CaCl<sub>2</sub> pH 6,8

**Elutionspuffer 1:** 10 mM Tris  
 100 mM Glycin  
 250 mM NaCl  
 300 mM AMS  
 3 mM CaCl<sub>2</sub>  
 40 % Ethylenglykol pH 6,5

**Elutionspuffer 2:** 10 mM Tris  
 100 mM Glycin  
 1,25 M NaCl  
 1,25 M NaSCN  
 3 mM CaCl<sub>2</sub>  
 40 % Ethylenglykol pH 7,0

**Ergebnisse:**

Probe	E/ml F VIII:C	%Ausb F VIII:C	E/mg F VIII:C	E/ml vWF	%Ausb vWF	E/mg vWF	F VIII:C zu vWF	Kollag.B. bez. vWF
Ausg.	11,0	100,0%	0,4	16,3	100,0%	0,6	1 : 1,48	0,7
F VIII/vWF	12,7	50,9%	133,7	14,7	39,8%		1 : 1,16	0,3
vWF	0,2	0,5%		23,4	37,2%	236,4		0,7

**B e i s p i e l 2 :**

1 l fresh frozen Plasma wird bei T >25°C aufgetaut und danach 1 + 2 mit Äquipuffer verdünnt. Die Lösung wird durch ein 0,45 µm-Filter geklärt. Eine mit 50 ml anti-vWF-Gel (Fa. IMMUNOTECH) gefüllte Säule wird mit ca. 5 SV Äquipuffer vorbereitet und darauf die geklärte Plasmalösung mit einem Fluß von 1 cm/min aufgetragen. Die unerwünschten Verunreinigungen werden mit 10 bis 20 SV Äquipuffer + 250 mM NaCl ausgewaschen. Die erste Elution liefert

- 13 -

Faktor VIII/vWF-Komplex; die zweite Elution vWF frei von Faktor VIII-Aktivität. Danach kann die Säule sofort wieder äquilibriert werden.

**Äquipuffer:** 5 g/l Na-Citrat  
2 E/ml Heparin pH 7,0

**Elutionspuffer 1:** 5 g/l Na-Citrat  
30 g/l AMS  
20 g/l NaSCN  
75 g/l Histidin  
5 g/l NaCl  
0,4 g/l CaCl<sub>2</sub> pH 7,0

**Elutionspuffer 2:** 5 g/l Na-Citrat  
50 g/l AMS  
50 g/l NaSCN  
75 g/l Histidin  
25 g/l NaCl  
0,4 g/l CaCl<sub>2</sub> pH 7,0

**Ergebnisse:**

Probe	E/ml F VIII : C	%Ausb F VIII : C	E/mg F VIII	E/ml vWF	%Ausb vWF	E/mg vWF	F VIII:C zu vWF	Kollag.B. bez. vWF
Ausg	0,3	100,0%	0,01	0,3	100,0%	0,01	1 : 1	1,0
F VIII/vWF	2,4	33,3%	42,86	1,8	24,3%		1 : 0,75	0,5
vWF	0,0	0,2%		4,5	76,0%	112,50		0,8

## P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Herstellung einer Präparation enthaltend einen hochgereinigten Komplex, bestehend aus den Komponenten Faktor VIII (Faktor VIII:C) und von Willebrand-Faktor (vWF), dadurch gekennzeichnet, daß ein Ausgangsmaterial, enthaltend Faktor VIII:C und vWF, mittels Immunaffinitätschromatographie gereinigt wird, wobei der Komplex aus Faktor VIII:C und vWF sowie der nicht-komplexierte Faktor VIII:C bzw. vWF fraktioniert eluiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Immunaffinitätschromatographie Antikörper eingesetzt werden, die gegen den vWF gerichtet sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Antikörper monoklonale Antikörper eingesetzt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper mit einer hohen Affinität zu vWF eingesetzt werden, welche den vWF auch in einem Medium mit 1 M Thiocyanat binden können.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der hochgereinigte Komplex mit einem Puffer, enthaltend ein Thiocyanat und/oder ein Ammoniumsalz, eluiert wird, vorzugsweise in einer Konzentration von höchstens 2 M, insbesondere im Bereich von 0,05 M - 1,5 M.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der hochgereinigte Komplex mit einem Puffer, enthaltend Ethylenglykol, Glycerin oder ein Polyalkylenglykol, eluiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß nicht-komplexierte Faktor VIII:C bzw. vWF mit einem Puffer, enthaltend ein chaotropes Agens, insbesondere Thiocyanat und/oder Ammoniumsalz, und/oder Alkalosalze und/oder

Glykole, wie Ethylenglykol, Glycerin oder ein Polyalkylenglykol, eluiert und gewonnen wird, wobei der Puffer eine gegenüber dem Puffer aus Anspruch 5 oder 6 erhöhte Konzentration bzw. Leitfähigkeit aufweist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der hochgereinigte Komplex durch weitere chromatographische Schritte, vorzugsweise Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, hydrophobe Chromatographie, Affinitätschromatographie oder Metallionenchelatchromatographie, gereinigt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein Behandlungsschritt zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren, vorzugsweise einer Hitzebehandlung, vorgenommen wird, welcher vorzugsweise am hochgereinigten Komplex vorgenommen wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial ein Mitglied aus der Gruppe, bestehend aus Plasma, einer Plasmafraktion, einem Zellkulturerstand und einem pharmazeutischen Präparat, verwendet wird.

11. Präparation, enthaltend einen hochgereinigten Komplex, bestehend aus den Komponenten Faktor VIII (Faktor VIII:C) und von Willebrand-Faktor (vWF), mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 70, vorzugsweise 100 bis 300 E Faktor VIII:C/mg, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

12. Präparation nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der vWF eine Kollagenbindungsaktivität im Bereich von 0,2 bis 0,6, bezogen auf vWF-Antigen (Plasmaeinheit/Plasmaeinheit), aufweist.

13. Präparation nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen frei von nicht-komplexiertem vWF bzw. Faktor VIII:C ist.

14. Präparation nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex in einer gegenüber Plasma um min-

- 16 -

destens 5000-fach, vorzugsweise 7100- bis 21400-fach, angereicherten Konzentration vorliegt.

15. Präparation nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie als pharmazeutische Präparation vorliegt.

16. Präparation, enthaltend hochgereinigten vWF, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

17. Präparation nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der vWF eine Kollagenbindungsaktivität von mindestens 0,7 pro vWF-Antigen (Plasmaeinheit/Plasmaeinheit) aufweist.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/AT 97/00069A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07K14/755 C07K1/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC:

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 86 01718 A (IMMUNOTECH SA ;BOURGOIS ALAIN (FR); DELEZAY MARYLENE (FR); FERT VI) 27 March 1986 cited in the application see the whole document ---	1-17
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 402 (C-633), 6 September 1989 & JP 01 144991 A (KAGAKU OYOGI KETSUSEI RIYOUHOU KENKYUSHO), 7 June 1989, see abstract ---	1-17 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 September 1997

Date of mailing of the international search report

26.09.97

## Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

## Authorized officer

Chakravarty, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 97/00069

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THROMB. RES. (UNITED STATES) , vol. 74, no. 4, 15 May 1994, pages 347-354, XP002039902 KOOPS ET AL.: "Factor VIII:C assay: influence of buffer components used in immunoaffinity chromatography for purification of factor VIII/von Willebrand factor" see the whole document ---	1-17
X	THROMB HAEMOST , vol. 57, no. 1, 3 February 1987, GERMANY, WEST, pages 102-105, XP002039903 HORNSEY VS ET AL.: "Immunoaffinity purification of factor VIII complex." cited in the application see the whole document ---	1-17
A	EP 0 281 089 A (BEHRINGWERKE AG) 7 September 1988 see the whole document ---	
A	ANN. CLIN. LAB. SCI. , vol. 19, no. 2, 1989, UNITED STATES, pages 84-91, XP002039904 WEINSTEIN R.E.: "Immunoaffinity purification of factor VIII" see the whole document -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. application No  
PCT/AT 97/00069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8601718 A	27-03-86	FR 2570276 A CA 1257211 A DE 3584817 A EP 0179006 A JP 1967937 C JP 6102680 B JP 6107700 A JP 6049720 B JP 62500520 T US 4670543 A	21-03-86 11-07-89 16-01-92 23-04-86 18-09-95 14-12-94 19-04-94 29-06-94 05-03-87 02-06-87
EP 0281089 A	07-09-88	DE 3707213 A AU 620799 B AU 1264688 A CA 1312278 A DE 3874914 A ES 2052621 T JP 63235867 A US 5021243 A	15-09-88 27-02-92 08-09-88 05-01-93 05-11-92 16-07-94 30-09-88 04-06-91

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat...es Aktenzeichen  
PCT/AT 97/00069

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C07K14/755 C07K1/22

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 86 01718 A (IMMUNOTECH SA ;BOURGOIS ALAIN (FR); DELEZAY MARYLENE (FR); FERT VI) 27.März 1986 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-17
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 402 (C-633), 6.September 1989 & JP 01 144991 A (KAGAKU OYobi KETSUSEI RIYOUHOU KENKYUSHO), 7.Juni 1989, siehe Zusammenfassung ---	1-17 -/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- \*'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfundung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfundung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfundenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfundung kann nicht als auf erfundenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. September 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26.09.97

Name und Postanschrift der internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Chakravarty, A

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/AT 97/00069
---

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	THROMB. RES. (UNITED STATES) , Bd. 74, Nr. 4, 15.Mai 1994, Seiten 347-354, XP002039902 KOOPS ET AL.: "Factor VIII:C assay: influence of buffer components used in immunoaffinity chromatography for purification of factor VIII/von Willebrand factor" siehe das ganze Dokument ---	1-17
X	THROMB HAEMOST , Bd. 57, Nr. 1, 3.Februar 1987, GERMANY, WEST, Seiten 102-105, XP002039903 HORNSEY VS ET AL.: "Immunoaffinity purification of factor VIII complex." in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-17
A	EP 0 281 089 A (BEHRINGWERKE AG) 7.September 1988 siehe das ganze Dokument ---	
A	ANN. CLIN. LAB. SCI. , Bd. 19, Nr. 2, 1989, UNITED STATES, Seiten 84-91, XP002039904 WEINSTEIN R.E.: "Immunoaffinity purification of factor VIII" siehe das ganze Dokument -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/AT 97/00069

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8601718 A	27-03-86	FR 2570276 A CA 1257211 A DE 3584817 A EP 0179006 A JP 1967937 C JP 6102680 B JP 6107700 A JP 6049720 B JP 62500520 T US 4670543 A	21-03-86 11-07-89 16-01-92 23-04-86 18-09-95 14-12-94 19-04-94 29-06-94 05-03-87 02-06-87
EP 0281089 A	07-09-88	DE 3707213 A AU 620799 B AU 1264688 A CA 1312278 A DE 3874914 A ES 2052621 T JP 63235867 A US 5021243 A	15-09-88 27-02-92 08-09-88 05-01-93 05-11-92 16-07-94 30-09-88 04-06-91